

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07351

研究課題名(和文)アтипカルな低分子量Gタンパク質群のGサイクル制御機構と生理的役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of physiological function and activation mechanism of atypical small GTPases

研究代表者

紺谷 圏二 (Kontani, Kenji)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30302615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ARL8はリソソーム機能に介在し、アтипカルな性状を有する低分子量Gタンパク質である。本研究ではマウス胚発生において、ARL8bが脳背側正中線の正常な発生に重要な低分子量Gタンパク質であることを明らかにした。脳背側正中線を構成する細胞群は、BMPシグナルによって運命決定される細胞群であるが、ARL8b欠損マウスでは、この細胞群でBMPシグナルが異常に亢進していた。これまでの知見も考え合わせると、ARL8bはリソソーム分解を介したBMPシグナルのshut-off機構に介在し、その機能欠損はBMPシグナルの異常亢進に伴う脳背側正中線の発生異常を惹起すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量Gタンパク質はヒトでは150種類以上存在し、これまで主に培養細胞を用いた解析からシグナル伝達系を初めとした細胞応答における重要性が明らかにされてきた。しかし、多くの低分子量Gタンパク質に関して、個体レベルでの役割はあまり分かっていない。この点に関して本研究は、これまでの研究代表者らの研究成果と合わせて、ARL8の哺乳動物個体における生理的役割を世界で初めて明らかにした点で学術的な意義がある。またこれらの知見は、ARL8の機能をコントロールすることにより、個体レベルでリソソーム機能を制御できる可能性を示唆しており、リソソームを標的とする薬剤の開発にも繋がりをう研究成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：ARL8 is an atypical small GTPase and involved in lysosomal function. In this study, using ARL8b-knockout mice, we found that ARL8 is important for the development of dorsal structures of the neural tube in mouse embryos. In addition, ARL8b-knockout embryos showed up-regulation of BMP signaling in the neural fold at E9.0. Considering the importance for BMP signaling during dorsal development, our findings suggest that loss of ARL8b results in defects in lysosomal degradation of endocytosed BMP receptors causing up-regulation of BMP signaling, thereby leading to the abnormal development of dorsal structures of the neural tube.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：低分子量Gタンパク質 リソソーム エンドサイトーシス ノックアウトマウス 胚発生 BMP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん原遺伝子産物 Ras に代表される低分子量 G タンパク質ファミリーはヒトでは 150 種類以上存在し、それらは一次構造上の特徴から、Ras、Rho/Rac、Rab、Arf、Ran といったサブファミリーに分類される。これまでの研究から、各種の低分子量 G タンパク質が、G サイクル (GTP と GDP の交換反応に伴う活性化状態の変化) を介して、シグナル伝達系、膜輸送系、細胞骨格系などにおいて重要な分子スイッチとして機能することが明らかになってきた。一方で研究代表者らは先に、生化学的性状や一次構造上の特徴が一般的な低分子量 G タンパク質とは異なる“アтипカル”な低分子量 G タンパク質群を同定し、それらの解析を進めてきた。例えば神経細胞特異的に発現する Di-Ras や、リソソームなどの酸性オルガネラに局在する ARL8 が、一般的な G タンパク質が細胞内で通常 GDP 結合型で存在するのとは逆に、主に GTP を結合した状態で存在することを明らかにしてきた (Kontani, *et al.*, *JBC*, 2002; Okai, *et al.*, *JCS*, 2004; Ogita, *et al.*, *JBC*, 2015)。また Rab45 や ARL13b のように、グアニンヌクレオチドとの結合に必要な G ドメインに加えて、EF ハンド、コイルドコイル、プロリンリッチドメインなどを有するなどのマルチ機能ドメイン G タンパク質が存在することも報告してきた (Shintani, *et al.*, *BBRC*, 2007; Hori, *et al.*, *BBRC*, 2008; Kontani, *et al.*, *Nature Mol. Page*, 2009)。さらに、ARL8 や ARL13b などのアтипカルな性状を有する低分子量 G タンパク質が、リソソームや一次繊毛といったオルガネラの形成・機能に関与することも報告してきた (Cevik, *et al.* *PLoS Gen*, 2013; Sasaki, *et al.* *MBC*, 2013; Nakae *et al.* *MBC*, 2010; Klassen, *et al.* *Neuron*, 2010; Cevik, *et al.* *JCB*, 2010)。しかし、それらの低分子量 G タンパク質の G サイクルの制御メカニズムや、哺乳動物個体における生理的役割については未解明な点が数多く残されている。以上の経緯から研究代表者は、「アтипカルな低分子量 G タンパク質群の G サイクル制御機構と生理的役割の解析」という本研究課題の着想に至り、解析を進めることとした。

2. 研究の目的

リソソームは、後期エンドソーム・ファゴソーム・オートファゴソームといった膜オルガネラと直接融合し、物質分解に重要な役割を果たすことが良く知られているが、この融合制御の分子機構については未解明な点も多い。申請者らはこれまでに、ARL8 がリソソームと後期エンドソームやファゴソームとの融合を正に制御することを明らかにしている (Sasaki, *et al.* *MBC*, 2013; Nakae *et al.* *MBC*, 2010)。また、ARL8 がリソソームのみならず、線虫においてシナプス小胞の機能動態に重要であることも報告している (Klassen, *et al.* *Neuron*, 2010)。ARL8 は主にリソソームに局在することが示された初めての G タンパク質であるが、近年の各種膜オルガネラに関するプロテオミクス解析から、リソソーム以外の種々の酸性オルガネラにも ARL8 が存在することが示されており、ARL8 は酸性オルガネラ全般において、何らかの普遍的に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。そこで本研究では、ARL8 のノックアウトマウスを用いた解析により、リソソームを初めとする各種酸性オルガネラの機能動態における ARL8 の生理的役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

哺乳動物には非常に相同性の高い ARL8a と ARL8b が存在する。本研究では ARL8b ノックアウトマウスとして、MMRRC より購入した ARL8b ジーントラップ ES 細胞から作製した ARL8b ジーントラップマウスを用いた。なお ARL8b ノックアウトマウスは、C57BL6J とバッククロスを十回以上行ったものを解析に用いた。マウス胚の切片作製及び各種染色等は定法に従って行った。

4. 研究成果

(1) Ar18b は胚発生における脳の形態形成に異常を呈する

まず Ar18b は胎生致死あるいは出生直後に致死となることが分かった。そこで Ar18b の胎仔に関して表現型解析を行ったところ、Ar18b では胚発生に遅延が生じ、胎生 12 日胚において小眼球の表現型や脳の形態形成に異常が観察された (図 1A, B)。また胎生 12 日胚の組織切片を用いて形態学的解析を行ったところ、Ar18b では脳室拡大、視床・海馬領域の形成不全 (図 1D, G)、中脳背側領域の神経上皮の肥厚 (図 1E, H)、基底核隆起の低形成 (図 1C, F)、といった中枢神経の構造に異常を呈することが明らかとなった。

(2) Ar18b では脳の背側正中線の発生が異常となる

視床・海馬は、胎生 10 日胚における脳の背側正中線を軸とした領域から発達・形成される領域であることから、胎生 10 日胚の背側領域に着目した解析を行った。

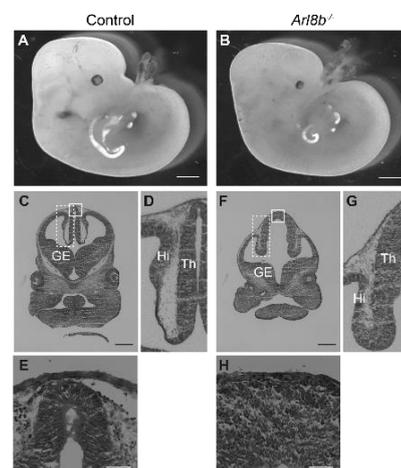


図 1. Ar18b 胚は脳形成に異常を呈する (Hi, 海馬; Th, 視床; GE, 基底核隆起)

脳の背側領域は正中線軸上においてアポトーシス細胞が頻繁に観察されることが報告されているが、*Arl8b*^{-/-}の脳背側正中線軸上ではコントロールに比べてアポトーシス細胞数が減弱していた (図 2A)。また、コントロール胚の背側正中線では EdU 陽性細胞数が少ないのに対し (図 2B)、*Arl8b*^{-/-}では他の領域と同程度に EdU 陽性であった (図 2C)。また蓋板の状態を検討する目的で、神経上皮細胞マーカーである Sox1 及び神経堤細胞のマーカー分子である Sox9 の発現を免疫染色により解析したところ、コントロールの蓋板では Sox1 の発現レベルは神経上皮に比べて低く、Sox9 は蓋板で陽性であったのに対し (図 2D, F)、*Arl8b*^{-/-}の蓋板に相当する領域では神経上皮と同程度に Sox1 が発現しており (図 2E)、Sox9 の発現は殆ど観察されなかった (図 2G)。以上の結果から、胎生 10 日目の *Arl8b*^{-/-}では脳の蓋板の発生に異常が生じることが明らかとなった。

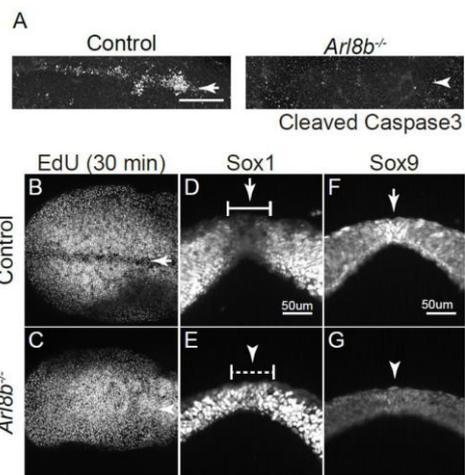


図 2. *Arl8b*^{-/-}では蓋板の発生が異常となる

(3) *Arl8b*^{-/-}では神経隆起の発生に異常が生じ、BMP シグナルが増強している

胎生 10 日目の蓋板は、神経管閉鎖期に神経外胚葉と非神経外胚葉の間に形成される領域 (Neural Plate Border, NPB) が発生の進行に伴い隆起 (神経隆起) し、互いに融合することで形成される。胎生 9 日目のコントロール胚の神経隆起では神経上皮に比べて Sox1 の発現レベルは低下していたが、*Arl8b*^{-/-}においては神経上皮細胞と同程度の Sox1 の発現が観察された (図 3A, B)。また、コントロール胚の神経隆起では細胞死が頻繁に観察されたが、*Arl8b*^{-/-}ではそのような細胞死は観察されなかった。従って、胎生 9 日目の *Arl8b*^{-/-}では神経隆起の発生が異常となっていると考えられた。また、これまでの研究から、神経隆起の出発点となる NPB は、BMP シグナルにより神経外胚葉と非神経外胚葉の間の領域に形成されると考えられている。そこで BMP シグナル下流である Smad1/5 の活性化状態 (pSmad1/5) を免疫染色により検討したところ、コントロールに比べて *Arl8b*^{-/-}では pSmad1/5 の染色レベルが増強していた (図 3C, D)。以上の結果から、*Arl8b*^{-/-}の神経隆起においては BMP シグナルが充進していることが示唆された。

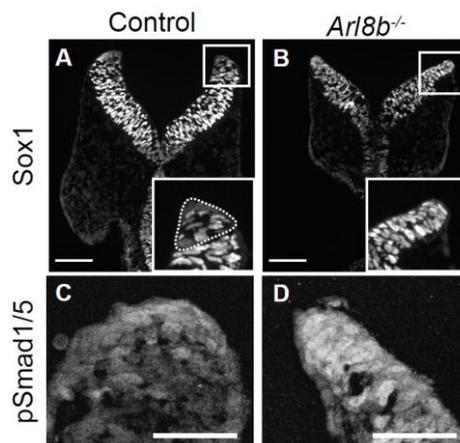


図 3. *Arl8b*^{-/-}では神経隆起の発生が異常となり、BMP シグナルが充進している

(4) 本研究のまとめ

本研究により、ARL8 が BMP シグナルの制御を介して蓋板の発生に関与することが示唆された。アフリカツメガエルやニワトリの胚を用いた解析から、神経外胚葉から非神経外胚葉に向かって BMP シグナルの勾配が形成され、“中程度の BMP シグナル”を受容した細胞が NPB の細胞に運命決定されることが示唆されている。*Arl8b*^{-/-}の神経隆起において BMP シグナルの充進が観察されたことから、*Arl8b*^{-/-}では異常に充進した BMP シグナルによって NPB の細胞運命決定が異常となる可能性が考えられた (図 4)。

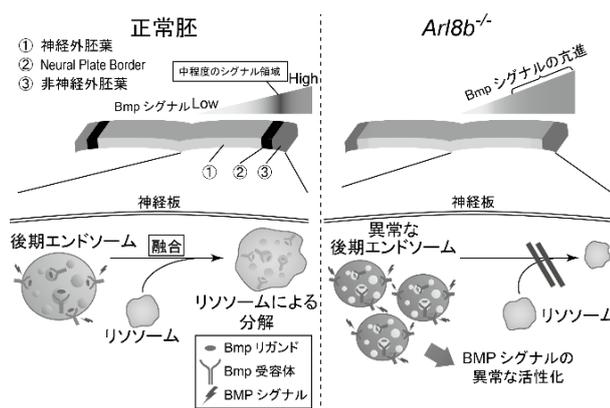


図 4. 本研究のまとめと想定されるモデル

活性化された Bmp リガンド-受容体複合体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソームで分解されると考えられている。また種々の受容体において、エンドサイトーシス後のエンドソームから、リガンド-受容体複合体を介したシグナルが発信されることも報告されている。これまでの研究により、ARL8 はリソソームによる物質分解に重要であると考えられていることから、*Arl8b*^{-/-}ではエンドサイトーシスされた活性化型 Bmp 受容体のリソソームによる分解効率が低下し、神経隆起において BMP シグナルが充進した結果、蓋板の発生が異常となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Toyama Y, Kontani K, Katada T, Shimada I.	4. 巻 5
2. 論文標題 Decreased conformational stability in the oncogenic N92I mutant of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax1595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aax1595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto K, Yamaguchi Y, Kishi Y, Kikko Y, Takasaki K, Maeda Y, Matsumoto Y, Oka M, Miura M, Ohata S, Katada T, Kontani K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Loss of the small GTPase Arl8b results in abnormal development of the roof plate in mouse embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 436, 448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Hikaru, Toma-Fukai Sachiko, Kontani Kenji, Katada Toshiaki, Shimizu Toshiyuki	4. 巻 115
2. 論文標題 GEF mechanism revealed by the structure of SmgGDS-558 and farnesylated RhoA complex and its implication for a chaperone mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9563 ~ 9568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1804740115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toyama Yuki, Kontani Kenji, Katada Toshiaki, Shimada Ichio	4. 巻 5
2. 論文標題 Conformational landscape alternations promote oncogenic activities of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 as revealed by NMR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav8945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aav8945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Shin-Ichiroh, Saitoh Yoshiko Mori, Kontani Kenji, Sato Katsuaki, Miyake Kensuke	4. 巻 31
2. 論文標題 ADP-ribosylation factor-like 8b is required for the development of mouse models of systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 225 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu H, Toma-Fukai S, Saijo S, Shimizu N, Kontani K, Katada T and Shimizu T	4. 巻 292
2. 論文標題 Structure-based analysis of the guanine nucleotide exchange factor SmgGDS reveals armadillo-repeat motifs and key regions for activity and GTPase binding	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 13441, 13448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.792556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oka M, Hashimoto K, Yamaguchi Y, Saitoh SI, Sugiura Y, Motoi Y, Honda K, Kikko Y, Ohata S, Suematsu M, Miura M, Miyake K, Katada T and Kontani K	4. 巻 130
2. 論文標題 Arl8b is required for lysosomal degradation of maternal proteins in the visceral yolk sac endoderm of mouse embryos	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Sci	6. 最初と最後の頁 3568, 3577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.200519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh SI, Abe F, Kanno A, Tanimura N, Mori Saitoh Y, Fukui R, Shibata T, Sato K, Ichinohe T, Hayashi M, Kubota K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kikko Y, Katada T, Kontani K and Miyake K	4. 巻 8
2. 論文標題 TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-01687-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木信、太田愛梨、寺本貴則、紺谷圏二
2. 発表標題 HPLCを用いた低分子量Gタンパク質のグアニンヌクレオチド結合状態の定量的解析
3. 学会等名 第18回生命科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木信、太田愛梨、寺本貴則、紺谷圏二
2. 発表標題 HPLCを用いた低分子量Gタンパク質Rhebの活性化状態の定量的解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤美夏、荒木信、紺谷圏二
2. 発表標題 疾患バイオマーカーを含有する細胞外ナノ粒子の放出割合の定量的解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木信、寺本貴則、鈴木理央、紺谷圏二
2. 発表標題 逆相イオンペアクロマトグラフィーを用いた低分子量G タンパク質のグアニンヌクレオチド型の定量的解析
3. 学会等名 第17回 生命科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木信、島田匠、青木拓人、本島清人、紺谷圏二
2. 発表標題 HMG-CoA還元酵素阻害剤によるmTORC1調節機構の解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紺谷圏二
2. 発表標題 マウス胚発生における低分子量 G タンパク質 Ar18b の役割
3. 学会等名 第69回 日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒木信、青木拓人、鈴木克征、本島清人、紺谷圏二
2. 発表標題 HMG-CoA還元酵素阻害薬によるオートファジー誘導機構の解析
3. 学会等名 第16回 生命科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒木信、青木拓人、鈴木克征、本島清人、紺谷圏二
2. 発表標題 スタチン誘導性オートファジーの分子機構の解析
3. 学会等名 平成29年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒木信、寺本貴則、鈴木理央、平沼翔太、小林友哉、紺谷圈二
2. 発表標題 HPLCを用いた低分子量Gタンパク質のグアニンヌクレオチドフォームの定量的解析
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒木 信 (Araki Makoto) (20552904)	明治薬科大学・薬学部・助教 (32684)	